Journal of Horticultural Science
https://jhs.um.ac.ir

Research Article
Vol. 38, No. 2, Summer 2024, p. 353-366

Investigation on the Effects of Carbon Nanotubes and Kinetin on Growth and Regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* Conditions

Y. Pourbeyrami Hir[1*], E. Chamani[2], M. Ahadzadeh[3], S. Shaker[4], R. Nabipour Sanjbod[3]

1, 2, 3 and 4- Associate Professor, Professor, Ph.D. Student and M.Sc., Department of Horticultural Sciences and Landscape Designing. Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: younes_ph62@uma.ac.ir)

Received:	13-10-2023	**How to cite this article:**
Revised:	24-01-2024	Pourbeyrami Hir, Y., Chamani, E., Ahadzadeh, M., Shaker, S., & Nabipour Sanjbod, R. (2024). Investigation on the effects of carbon nanotubes and kinetin on growth and regeneration of *Salvia nemorosa* under *in vitro* conditions. *Journal of Horticultural Science, 38*(2), 353-366. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293
Accepted:	28-01-2024	
Available Online:	28-01-2024	

Introduction

The use of medicinal plants has surged in recent times, with a substantial portion of modern medicines derived from botanical sources. This surge in demand underscores the potential of cultivating and producing medicinal plants to not only bolster public health but also significantly contribute to a society's economic well-being.*Salvia nemorosa* is an herbaceous, perennial, and medicinal plant. This valuable plant belongs to the Labiatae family. The aerial parts of the plant, especially the leaves, contain essential oils. Furthermore, *S. nemorosa* contains chemical compositions such as saponin, organic acids, diterpenes, triterpenes, polyphenols, and a bitter substance called picrosalvin. In the plant tissue culture, the preparation of culture medium and formulation compatible with the tissue of the tested plant is vital for efficient regeneration and plant growth. Generally, no specific culture medium can be recommended for the growth of explants, and is necessary to make changes in the culture medium in order to better respond to different types of explants. Carbon nanotubes are nanomaterials that can be added to the culture medium and increase the growth rate of different parts of the plant such as roots, stems, and branches. Cytokines also commonly participate in cell divisions and proliferate shoots by removing terminal dominance. Considering the mentioned importance, this study was conducted to investigate the effect of carbon nanotubes, kinetin, and their interactions on some morphophysiological and phytochemical properties of *S. nemorosa* under *in vitro* conditions.

Materials and Methods

This experiment was carried out in the tissue culture and biotechnology laboratory of the Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Mohaghegh Ardabili. This study was conducted based on factorial design (completely randomized design) with five replications. The treatments included five levels of carbon nanotubes (0, 10, 20, 40, and 80 mg/L CNT) and three levels of kinetin (0, 2, and 4 mg/L CK). The seeds of *S. nemorosa* were sterilized with 70% ethanol for 40 seconds and then 2.5% hypochlorite sodium for 15 minutes (then the seed were washed with deionized water three times 3, 5, and 15 minutes). The sterilized seeds were planted in MS medium containing 30 g/L sucrose and 8 g/L agar, and then transferred to a growth chamber. After 40 days, the obtained seedlings were cut into single nodes by removing leaves and transferred to the main treatment medium. After that, some traits such as fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedlings height, viability rate, germination rate, chlorophylls a, b, carotenoid content, phenol content, and flavonoid content were examined. The obtained data related to the experiment were analyzed with

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293

SAS software, the comparison of data means was done with Duncan's test, and the graphs were plotted using Excel software.

Results and Discussion

The results indicated that the interaction effect of carbon nanotubes and kinetin on the indices of fresh weight, number of branches, number of leaves, number of roots, leaf area, root length, seedling height, survival percentage, germination percentage, pigment content photosynthesis was not significant. On the contrary, the interaction effect of two treatments on the content of total flavonoid and total phenol showed a significant difference. The highest phenol content was obtained in the treatment combination of 80 mg/L of carbon nanotubes and 4 mg/L of kinetin. On the other hand, increasing the concentration of carbon nanotubes up to 80 mg/L, the average shoot production, number of leaves, leaf area, plant height, root number, root length, chlorophyll a, b, carotenoid, phenol and flavonoid content. increased significantly. Also, by increasing the concentration of kinetin (4 mg/liter), the number of branches, the content of chlorophyll a and b increased significantly.

Conclusion

The characteristics of the *S. nemorosa* plant, except for fresh weight, significantly increased under the influence of carbon nanotube treatments. However, under the influence of kinetin treatment, only the number of branches, chlorophyll a, b, phenol content, and flavonoid content showed a significant increase. Based on the results of this study, carbon nanotubes can be used for proliferation and increasing the secondary metabolites of *S. nemorosa*. Despite the results of this study, it is still possible to use higher concentrations of carbon nanotubes in future research in order to increase the phytochemical properties and productivity of other medicinal plants.

Keywords: Chlorophyll, Cytokinin, Nanoparticles, Tissue culture

نشریه علوم باغبانی
https://jhs.um.ac.ir

مقاله پژوهشی
جلد ۳۸، شماره ۲، تابستان ۱٤۰۳، ص. ۳٦٦-۳۵۳

بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی مریم گلی (*Salvia nemorosa*) تحت شرایط درون شیشه‌ای

یونس پوربیرامی هیر[۱*]- اسماعیل چمنی[۲]- مهسا احدزاده[۳]- شبنم شاکر[٤]- رقیه نبی پور سنجبد[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸

چکیده

گونه *Salvia nemorosa* گیاهی دارویی، علفی و چند ساله از خانواده نعناعیان است. نانو لوله‌های کربن نوعی دگرشکلی[۶] از اتم‌های کربن هستند که به‌دلیل خاصیت آب‌دوستی موجب افزایش جذب آب و رشد قسمت‌های مختلف گیاهان می‌شوند. سایتوکنین‌ها نیز معمولاً در تقسیمات سلولی شرکت می‌کنند و با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند. با توجه به اهمیت‌های ذکر شده، این پژوهش به‌منظور بررسی تأثیر نانو لوله‌های کربن، کینتین و همچنین، اثرات متقابل آن‌ها بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مریم گلی تحت شرایط درون شیشه‌ای انجام شد. بعد از کشت بذر در محیط کشت MS، گیاهان حاصل با حذف برگ‌ها به‌صورت تک گره برش داده شده و به محیط تیمار اصلی نانو لوله‌های کربن (صفر، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) و کینتین (صفر، دو و چهار میلی‌گرم بر لیتر) منتقل شدند. پس از گذشت ۴۰ روز برخی شاخص‌های مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر متقابل نانو لوله‌های کربن × کینتین بر شاخص‌های وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی معنی‌دار نبود. در مقابل، اثر متقابل دو تیمار بر محتوای فلاونوئید و فنل کل اختلاف معنی‌دار را نشان داد. بیشترین محتوای فنل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین به‌دست آمد. از طرف دیگر، افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن تا ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر، میانگین تولید شاخساره، تعداد برگ، سطح برگ، ارتفاع گیاه، تعداد ریشه، طول ریشه، محتوای کلروفیل a، b، کارتنوئید، محتوای فنل و فلاونوئید را به‌طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین با افزایش غلظت کینتین (چهار میلی‌گرم بر لیتر)، تعداد شاخه، محتوای کلروفیل a و b به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. براساس نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان از نانو لوله‌های کربن (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر) به‌منظور پرآوری و افزایش متابولیت‌های گیاه مریم گلی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سایتوکینین، کشت بافت، کلروفیل، نانوذرات

مقدمه

گیاهان دارویی یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی هر کشوری هستند که در صورت شناخت علمی، کشت، توسعه و بهره‌برداری صحیح می‌توانند نقش مهمی در سلامت جامعه، صادرات غیرنفتی و اشتغال‌زایی داشته باشند (Govil & Singh, 2010). گونه *Salvia nemorosa* گیاهی علفی و چند ساله، به‌علت داشتن کرک‌های ترشحی که سرشار از روغن‌های اتری و اسانس می‌باشد، به‌عنوان گیاه زینتی، دارویی، معطر و مغذی کاربرد دارد. وجود انواع ترپن‌ها در این گونه، آن‌را به‌عنوان یک گیاه دارویی مفید مجزا ساخته است. ترکیبات ترپنی شناسایی شده در این گونه شامل مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترپن‌ها و ترکیبات غیرفرار ترپنی ازجمله دی‌ترپن‌ها و تری‌ترپن‌ها می‌باشند. همچنین در این گیاهان ترکیباتی مانند پلی‌فنول‌ها و فنول‌هایی مانند فلاونوئیدها و

۱، ۲، ۳ و ۴- به‌ترتیب دانشیار، استاد، دانشجوی دکتری و کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(*- نویسندهٔ مسئول: Email: younes_ph62@uma.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jhs.2024.84810.1293

6- Allotropy

همچنین مشتقات کافئیک اسید نیز یافت شده است (Ulubelen, 1994). فعالیت‌های بیولوژیکی مریم گلی ناشی از وجود رزماریک اسید و مشتقات آن است. این ترکیبات دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، ضد تومور، ضد موتاسیون، ضدقارچ، ضد ویروس و باکتری می‌باشد (Salimpour *et al*., 2014).

نانو مولکول‌ها موادی هستند که اخیراً از طریق نانو فناوری ایجاد شده‌اند. توسط این ساختارها، امکان دست‌کاری‌ها در سطح نانو و تنظیم و کاتالیز واکنش‌های شیمیایی وجود دارد. در این میان، نانو لوله‌های کربنی نوعی دگرشکلی از اتم‌های کربن هستند که در سال‌های اخیر شناسایی شده‌اند (Ke *et al*., 2011). یکی از ویژگی‌های مهم نانو لوله‌های کربنی این است که می‌توان آن‌ها را به حالت محلول در آب درآورد و با توجه به خاصیت آب‌دوستی در زمینه‌های شیمیایی و بیولوژیکی مورد استفاده قرار داد (Dobranszki *et al*., 2005). نانو لوله‌های کربنی محلول در آب به روش‌های مختلفی نظیر، استفاده در محیط کشت سلول گیاهی، بذر یا گیاهچه (Wang *et al*., 2012)، استفاده در آب آبیاری گیاهان و یا به‌صورت ترکیب با خاک رشدی گیاه (Khodakovskaya *et al*., 2012) مورد استفاده قرار می‌گیرند و باعث افزایش میزان رشد در قسمت‌های مختلف گیاهان نظیر ریشه، ساقه و شاخه‌ها می‌شوند (Tripathi *et al*., 2011). کاربرد نانو لوله های کربنی در کشاورزی اغلب در زمینه سموم گیاهی، انتقال ژن، بهبود مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی، استفاده در مواد مغذی کارآمد و افزایش رشد گیاهان می‌باشد (Wang *et al*., 2012). توانایی این مواد در افزایش رشد گیاهان اغلب به‌دلیل ساختار و ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها می‌باشد. علاوه‌براین، توانایی افزایش رشد گیاه توسط نانو لوله‌های کربنی به انواع آن‌ها (تک لایه یا چند لایه بودن) و همچنین وجود گروه‌های عاملی بر روی سطح آن‌ها نسبت داده شده است (Lacerda *et al*., 2012).

انتخاب محیط کشت و تهیه فرمولاسیون سازگار با بافت گیاه مورد آزمایش، برای موفقیت در کشت بافت ضروری است. هیچ محیط کشت مشخصی را نمی‌توان برای رشد انواع مختلف ریزنمونه توصیه کرد و در اغلب موارد لازم است که تغییراتی در محیط کشت به‌منظور پاسخ‌دهی بهتر انواع مختلف ریزنمونه صورت پذیرد (Smith, 2000). تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه سایتوکنین‌ها کاربرد بسیار فراوانی در کشت بافت گیاهان دارند و باعث تنظیم رشدونمو اندام‌ها در محیط درون شیشه‌ای می‌گردند. همچنین این ترکیبات، در تولید جنین در کشت سوسپانسیون سلولی اهمیت بسیار زیادی دارند (Bhojwani & Dantu, 2013). در کشت شاخساره که فعالیت مریستم‌ها توسط هورمون‌ها کنترل می‌شود، به‌طور معمول از سایتوکنین استفاده می‌گردد. سایتوکنین‌ها معمولاً در تقسیمات سلولی و تمایزیابی شاخه‌های نابجا از کالوس و بافت‌های گیاهی شرکت می‌کنند. این ترکیبات به‌طور معمول با حذف غالبیت انتهایی باعث پرآوری شاخه‌ها می‌شوند (Bagheri *et al*., 2013).

پاسخ‌های متنوعی در زمینه کاربرد نانو لوله‌های کربنی بر رشد و فیزیولوژی گیاهان مشاهده شده است که این تنوع به نوع نانو لوله‌های مورد استفاده و گونه گیاهی وابسته است. در پژوهشی گزارش شد که این ترکیبات تأثیر مثبتی بر افزایش طول ریشه خیار و پیاز داشته، رشد ریشه گوجه‌فرنگی را کاهش داده و بر رشد ریشه هویج و کلم تأثیر نداشته است (Cañas *et al*., 2008). در مطالعه دیگری، نانو لوله‌های کربنی سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی، افزایش طول ساقه و همچنین افزایش ۲/۵ برابری وزن دانهال در بذور گوجه‌فرنگی شد، ولی بر طول ریشه دانهال‌ها تأثیری نداشت (Khodakovskaya *et al*., 2009). در تحقیق دیگری روی گوجه‌فرنگی مشخص شد که نانو لوله های کربن سبب افزایش دو برابری زیست‌توده این گیاه شده و بر سایر ویژگی‌های رشدی آن تأثیر نداشته است (Alimohammadi *et al*., 2011).

در سال‌های اخیر، نحوه تأثیر نانوذرات بر روی رشدونمو گیاهان مورد توجه قرار گرفته است، بااین‌حال، هنوز خلأهایی در رابطه با تأثیر نانومواد بر رشد گیاهان دارویی وجود دارد. با وجود مطالعات بسیاری که بر روی مریم گلی صورت گرفته است، هنوز اطلاعاتی در مورد تأثیر نانو لوله‌های کربنی به همراه تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌ویژه کینتین بر ویژگی‌های رشدی و فیتوشیمیایی مریم گلی در دسترس نیست. ازاین‌رو، در این مطالعه غلظت‌های مختلف این دو فاکتور بر شاخص‌های متعددی بررسی خواهد شد تا غلظت‌های بهینه به‌دست آید.

مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر در محل آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی و فضای سبز دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. این پژوهش به‌صورت آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی و با پنج تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی مورد استفاده شامل کینتین در سه سطح صفر (شاهد)، دو و چهار میلی‌گرم بر لیتر و همچنین نانو لوله‌های کربن (US Research Nanomaterials, Inc.) در پنج سطح صفر (شاهد)، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بوده است. ویژگی‌های نانو لوله‌های کربنی به شرح جدول ۱ بود:

جدول ۱- مشخصات نانولوله‌های کربنی
Table 1- Characteristics of carbon nanotubes

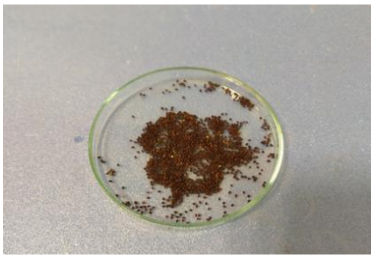
Single-walled carbon nanotubes (SWNTs, SWCNTs) نانولوله‌های کربنی تک جداره	
خلوص Purity	بیش از ۹۰ درصد وزنی Single-walled nanotubes > 90 wt%
قطر خارجی OD	۱-۲ نانومتر 1-2 nm
قطر داخلی ID	۰/۸ – ۱/۶ نانومتر 0.8-1.6 nm
قطر متوسط Average diameter	۱/۱ نانومتر 1.1 nm
طول Length	۵-۳۰ میکرومتر (میکروسکوپ الکترونی عبوری) 5-30 um (TEM)
مساحت سطح ویژه SSA	بیش از ۳۸۰ متر مربع بر گرم > 380 $m^2.g^{-1}$
خاکستر Ash	کمتر از ۱/۵ درصد وزنی < 1.5 wt%
چگالی ظاهری Tap density	۰/۱۴ گرم بر سانتی‌متر مکعب 0.14 $g.cm^{-3}$
چگالی حقیقی True density	تقریبا ۲/۱ گرم بر سانتی‌متر مکعب ~2.1 $g.cm^{-3}$
رسانایی الکتریکی Electric conductivity	بیش از ۱۰۰ زیمنس بر سانتی‌متر > 100 $S.cm^{-1}$
رسانایی حرارتی Thermal conductivity	۵۰-۲۰۰ وات بر متر کلوین 50-200 $W.m^{-1}.K^{-1}$
رنگ Color	مشکی Black
روش ساخت نانولوله‌های کربنی تک جداره Single-walled Carbon Nanotubes (SWNTs, SWCNTs) Manufacturing Method	رسوب‌دهی بخار شیمیایی CVD

به‌منظور پراکندگی[1] نانو لوله‌های کربنی، مقادیر مناسبی (براساس غلظت‌های مورد آزمایش) از آن‌ها در آب دیونیزه شده به‌شکل سوسپانسیون حل شدند. سپس به‌مدت ۳۰ دقیقه (شش بار به‌مدت پنج دقیقه) تحت اولتراسونیک کاملاً همگن شدند. هر پنج دقیقه یک بار دستگاه متوقف شد تا از بروز گرما و تولید کف جلوگیری شود. پس از اولتراسونیک، مایع همگن با دور ۲۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا ذرات حل نشده حذف شود. این مایع حاصل تا بیش از شش ماه می‌تواند پایدار باشد.

برای انجام این پژوهش بذرهای مریم گلی (*Salvia nemorosa*) (شکل ۱) ابتدا به‌مدت ۴۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰ درجه به‌صورت سطحی ضدعفونی شدند. سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد قرار گرفتند و پس از آن سه بار (۳، ۵ و ۱۵ دقیقه) با آب دیونیزه شسته شدند. بذور ضدعفونی شده در شیشه مربایی حاوی محیط کشت MS با ۳۰ گرم ساکارز و هشت گرم آگار کشت شدند. بذرهای کشت شده سپس به اتاقک رشد با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد و لامپ های فلورسنت با شدت نور ۲۰۰۰ لوکس (۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) انتقال یافتند. پس از مدت ۴۰ روز گیاهان حاصل از رشد بذرها بعد از حذف برگ‌ها به‌صورت تک گره برش داده شده و در محیط تیمار اصلی کشت شدند. پس از ۶۰ روز، گیاهان از نظر شاخص های متعددی مورد بررسی قرار گرفتند.

پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از محیط کشت، ابتدا محیط کشت اطراف آن‌ها به‌صورت کامل تمیز شده و سپس با استفاده از ترازو، وزن‌تر اندازه‌گیری شد. تعداد سرشاخه و برگ و ریشه شمارش گردید. اندازه گیری سطح برگ با استفاده از دستگاه سطح برگ سنج (مدل دلتا تی انگلستان) اندازه‌گیری شد. طول ریشه و ارتفاع گیاهچه نیز با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری گردید. درصد زنده‌مانی و جوانه‌زنی گیاهچه‌ها پس از خروج از محیط کشت محاسبه شد.

1- Disperse





شکل ۱- بذر گیاه مریم گلی گونه *Salvia nemorosa*

Figure 1- The seeds of *Salvia nemorosa* species

به‌منظور اندازه‌گیری کلروفیل a، b و کارتنوئید از روش لیختن تالر (Lichtenthaler, 1987) استفاده شد. عصاره به‌دست آمده در دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موجهای ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد. غلظت نهایی کلروفیل a و b و کارتنوئید با استفاده از معادله‌های زیر محاسبه شد:

$$\text{Chlorophyll a} = (19.3 * A663 - 0.86 * A645)\ V/100W$$

$$\text{Chlorophyll b} = (19.3 * A645 - 3.6 * A663)\ V/100W$$

$$\text{Carotenoides} = 1000(A470) - 3.27(\text{mg chl. a}) - 104(\text{mg chl. b})/2$$

میزان ترکیبات فنلی موجود در عصاره گیاه براساس روش اسلینکارد و سینگلتون (Slinkard & Singleton, 1977)، با کمی تغییر و با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو اندازه‌گیری شد، سپس میزان جذب رنگ در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری فلاونوئید به‌روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید و با روش کومار و شرما (Kumar & Sharma, 2015)، انجام شد. جذب مخلوط در طول موج ۴۱۵ نانومتر خوانده شد.

در مطالعه حاضر پنج تکرار و در هر واحد آزمایشی چهار گیاهچه در نظر گرفته شد. داده‌های بدست آمده مربوط به آزمایش با نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها نیز با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم گردید.

نتایج و بحث

تعداد شاخه پرآوری شده

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین بر تعداد شاخه پرآوری شده معنی‌دار نبود. بااین‌حال، غلظت های مختلف نانو لوله‌های کربن و کینتین به‌تنهایی بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم گلی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (چهار عدد) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربن بود که با شاهد اختلاف معنی‌دار داشت (شکل ۲–الف). از طرف دیگر، مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که بیشترین تعداد شاخه پرآوری شده (سه عدد) مربوط به غلظت چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین آن (دو عدد) مربوط شاهد بوده است (شکل ۲–ب). در پژوهشی دیگر، تأثیر نانو لوله‌های کربن چند جداره بر باززایی درون شیشه‌ای گیاه سیب زمینی مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش، در غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی افزایش شاخه‌زایی و باززایی مشاهده شد. در پژوهشی دیگر، استفاده از غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی به همراه دو میلی‌گرم بر لیتر بنزیل آدنین منجر به بیشترین شاخه‌زایی و باززایی در پسته گردید (Aghasi *et al*., 2018).

تعداد برگ و سطح برگ

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر متقابل دو فاکتور بر شاخص تعداد برگ و سطح برگ معنی‌دار نبود. بااین‌حال، غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به‌طور معنی‌داری (در سطح احتمال یک درصد) این شاخص‌ها را تحت تأثیر قرار دادند (جدول ۲). مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد برگ نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد برگ تولید شده نیز افزایش یافت، به‌طوری که غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین تعداد برگ (۱۷ عدد) را تولید کرد. کمترین برگ نیز (هشت عدد) از شاهد به‌دست آمد (شکل ۳– الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص سطح برگ نشان داد که بیشترین سطح برگ (شش سانتی‌متر مربع) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین (۱/۴ سانتی‌متر مربع) در شاهد به‌دست آمد که اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۳– ب). در پژوهشی تأثیر غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربنی در گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت که در آن بیشترین سطح برگ و تعداد برگ (۴۲ عدد) در غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش شد (Khodakovskaya, 2013). در پژوهش دیگری که روی گیاه نخود صورت گرفت، استفاده از نانو لوله‌های کربنی تک جداره با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر لیتر منجر به افزایش تعداد شاخه، برگ و همچنین سطح برگ گردید. در واقع، نانو لوله‌های کربنی تک جداره منجر به جذب بهتر آب می‌شوند و در نتیجه رشد قسمت‌های مختلف گیاه افزایش می‌یابد (Tripathi *et al*., 2011).

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر نانو لوله‌های کربن و سایتوکنین بر برخی صفات گیاه مریم گلی

Table 2- ANOVA (mean squares) for the effect of carbon nanotubes and cytokine on the some traits of *Salvia nemorosa*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	وزن تر Fresh weight	تعداد شاخه پرآوری شده Number of branch	تعداد برگ Number of leaves	تعداد ریشه Number of roots	سطح برگ leaf area	طول ریشه Root length	ارتفاع گیاهچه Seedling height	درصد زنده مانی Survival percentage	درصد جوانه‌زنی Germination percentage
نانو لوله‌های کربن Carbon nanotubes	4	0.0280^{ns}	08239^{**}	3.5114^{**}	2.6798^{**}	3.3563^{**}	6.3546^{*}	19718^{**}	1.3830^{ns}	0.9945^{ns}
سایتوکنین Cytokine	2	0.0043^{ns}	08532^{**}	09024^{ns}	0.6103^{ns}	0.4837^{ns}	4.0080^{ns}	0.3753^{ns}	0.4602^{ns}	0.2935^{ns}
نانو لوله × سایتوکنین Carbon nanotube × cytokine	8	0.0158^{ns}	0.1992^{ns}	0.8741^{ns}	0.7082^{ns}	0.1183^{ns}	2.2804^{ns}	0.0815^{ns}	4.8010^{ns}	4.1790^{ns}
خطا Error	60	0.012	0.164	0.83	0.658	0.232	2.28	0.126	7.08	6.52
ضریب تغییرات CV		11.57	22.14	26.48	43.74	24.24	50.82	21.92	32.79	31.02

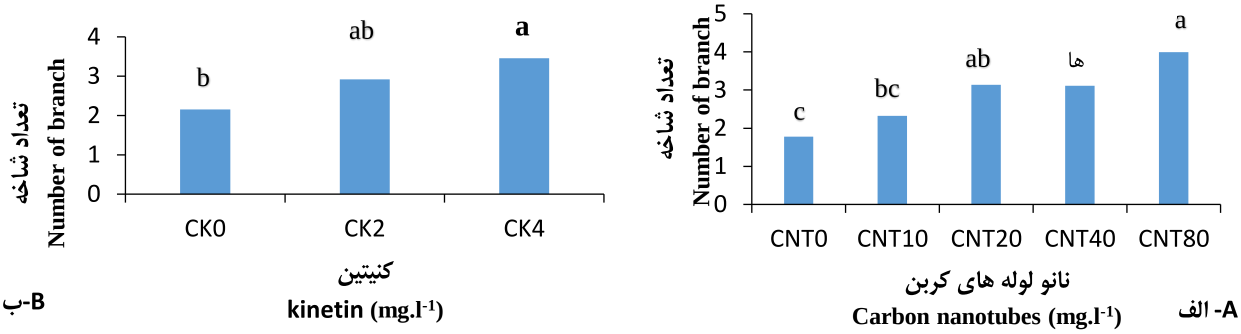
ادامه جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) تأثیر نانو لوله‌های کربن و سایتوکنین بر برخی صفات گیاه مریم گلی

Table 2 Continued- ANOVA (mean squares) for the effect of carbon nanotubes and cytokine on the some traits of *Salvia nemorosa*

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کارتنوئیدها Carotenoids	فلاونوئید کل Total flavonoid	فنل کل Total phenol
نانو لوله‌های کربن Carbon nanotubes	4	0.096^{**}	0.103^{**}	0.29^{**}	0.238^{**}	6.484^{**}
سایتوکنین Cytokine	2	0.013^{*}	0.014^{*}	0.013^{ns}	3.548^{**}	103.59^{**}
نانو لوله × سایتوکنین Carbon nanotube × cytokine	8	0.003^{ns}	0.0043^{ns}	0.008^{ns}	0.018^{*}	0.236^{**}
خطا Error	60	0.004	0.0043	0.008	0.104	0.0034
ضریب تغییرات CV		34.69	34.00	34.12	4.80	5.44

ns، ** و * به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد.

ns, * and **: Non-significant, and significant at 5% and 1% of probability levels, respectively.

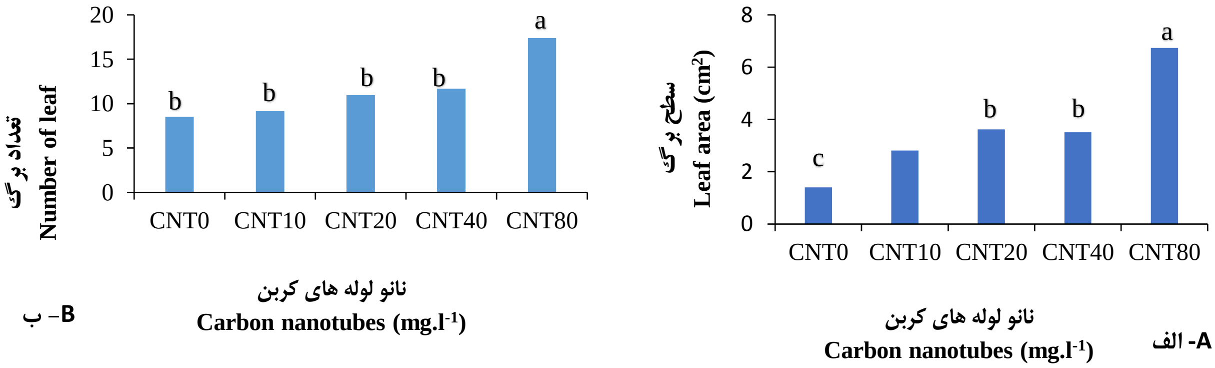


شکل ۲- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر تعداد شاخه پرآوری شده مریم گلی

Figure 2- The effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on the number of branches in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$ kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).



شکل ۳- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد برگ (الف) و سطح برگ (ب) گیاه مریم گلی

Figure 3- The effect of carbon nanotubes on the number of leaves (A) and leaf area (B) in *Salvia nemorosa*

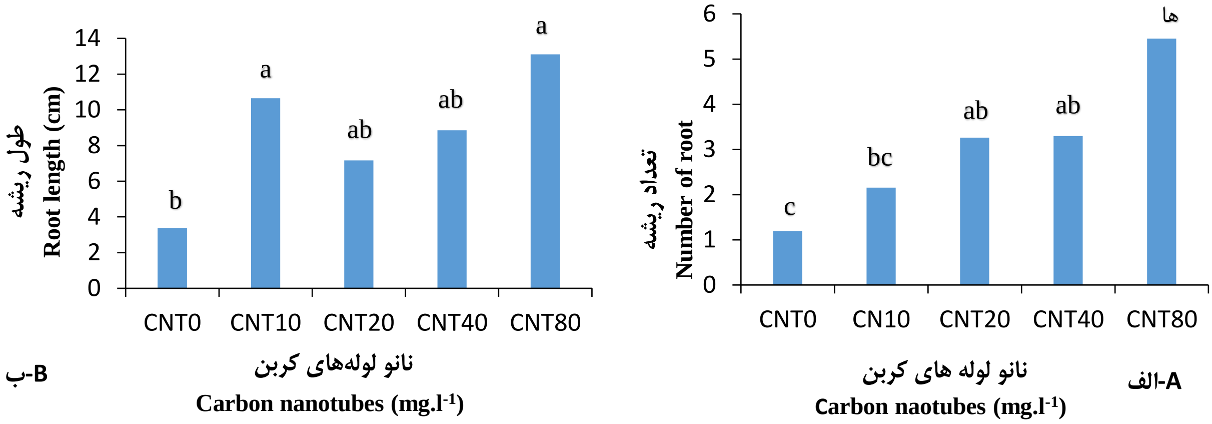
CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes (DMRT, $p \leq 0.05$).

تعداد ریشه و طول ریشه

شاخص تعداد ریشه و طول ریشه به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار قرار نگرفت. بااین‌حال، بررسی تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص‌های تعداد ریشه و طول ریشه مشخص گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر این شاخص‌ها به‌ترتیب در سطح احتمال یک درصد و پنج درصد معنی‌دار است (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین تأثیر این ماده بر شاخص تعداد ریشه نیز نشان داد که با افزایش غلظت نانو لوله کربن تعداد ریشه تولید شده افزایش یافته، به‌طوری‌که کمترین ریشه تولید شده در شاهد (یک عدد) و بیش‌ترین در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربنی (پنج عدد) به‌دست آمد (شکل ۴- الف). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر طول ریشه نشان داد که بلندترین طول ریشه (۱۳ سانتی‌متر) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین (سه سانتی‌متر) مربوط به شاهد بوده است (شکل ۴- ب). نانو لوله‌های کربنی با توجه به تنش محیطی که ایجاد می‌کنند، گیاهان تحت تیمار را وادار به گسترش اندام‌های زیر زمینی خود می‌کنند و بدین ترتیب، گیاه شرایط تنش را

تحمل می‌کند (Falahi *et al.*, 2009). عبادی و همکاران (Ebadi *et al.*, 2012)گزارش کردند که در گیاه مریم گلی سهندی تحت تأثیر تیمار نانو لوله‌های کربن (۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر)، طول ریشه‌چه افزایش یافته است.



شکل ٤- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر تعداد ریشه (الف) و طول ریشه (ب) گیاه مریم گلی

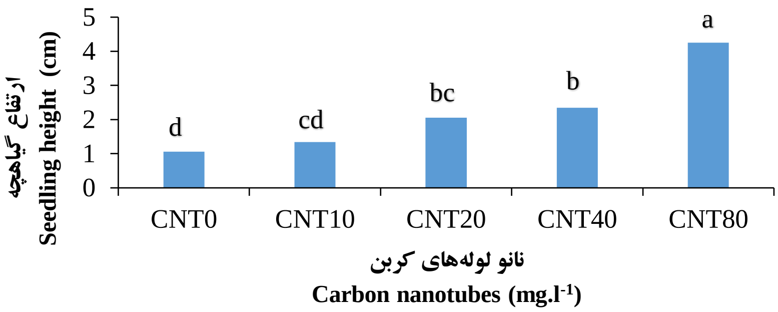
Figure 4- The effect of carbon nanotubes on the number of roots (A) and root length (B) in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes (DMRT, $p \leq 0.05$).

ارتفاع گیاهچه

در رابطه با شاخص ارتفاع گیاهچه مشاهده شد که غلظت‌های مختلف نانو لوله‌های کربن به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) طول گیاهچه را تحت تأثیر قرار داده‌اند، ولی اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین معنی‌دار نشد (جدول ۲). بلندترین طول گیاهچه (چهار سانتی‌متر) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کوتاه‌ترین آن (یک سانتی‌متر) مربوط به شاهد اندازه‌گیری شده است که اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند (شکل ۵). کاربرد ریز لوله‌های کربنی چند جداره کربوکسیله سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر و همچنین وزن تر و خشک ریشه و ساقه، تعداد و اندازه برگ، طول ریشه و ساقه در سه گیاه سویا، جو و ذرت شده است (Lahiani *et al.*, 2013).



شکل ٥- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر ارتفاع گیاهچه مریم گلی

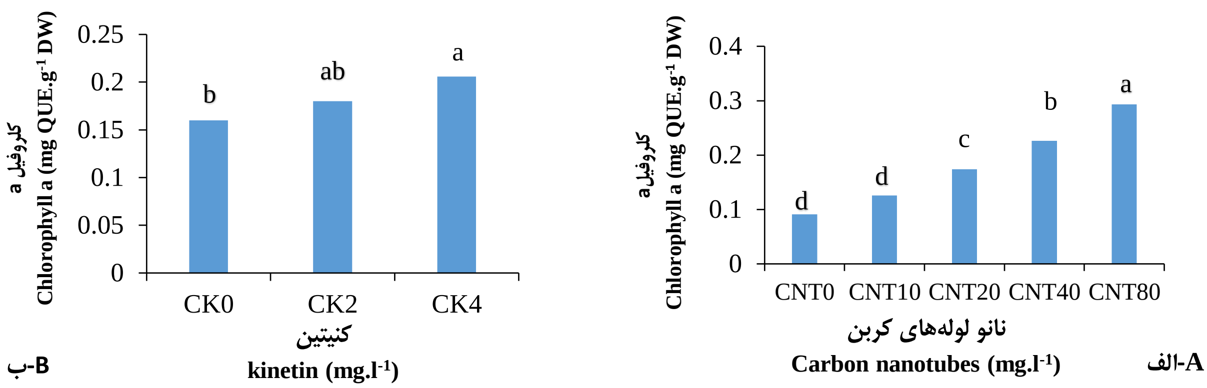
Figure 5- The effect of carbon nanotubes on the seedling height in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes.

کلروفیل a

با استفاده از تجزیه واریانس داده‌ها مشاهده گردید که تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کلروفیل a در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بوده است. درصورتی‌که، اثر متقابل دو فاکتور مورد آزمایش بر شاخص کلروفیل a معنی‌دار نبود (جدول ۲). به عبارت دیگر، میزان کلروفیل a به‌موازات افزایش نانو لوله‌های کربن، افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۰/۲۹۳ میلی‌گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و کمترین آن (۰/۰۹۱ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده گردید که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۶- الف). همچنین تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که غلظت‌های مختلف کینتین به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال پنج درصد) میزان کلروفیل a را افزایش داده است (جدول ۲). بعد از مقایسه میانگین داده‌ها مشخص شد که همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل a نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل a (۰/۲۰۶ میلی‌گرم) مربوط به تیمار چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل a (۰/۱۶ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده شد (شکل ۶- ب).



شکل ٦- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل a در گیاه مریم گلی

Figure 6- Effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll a content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

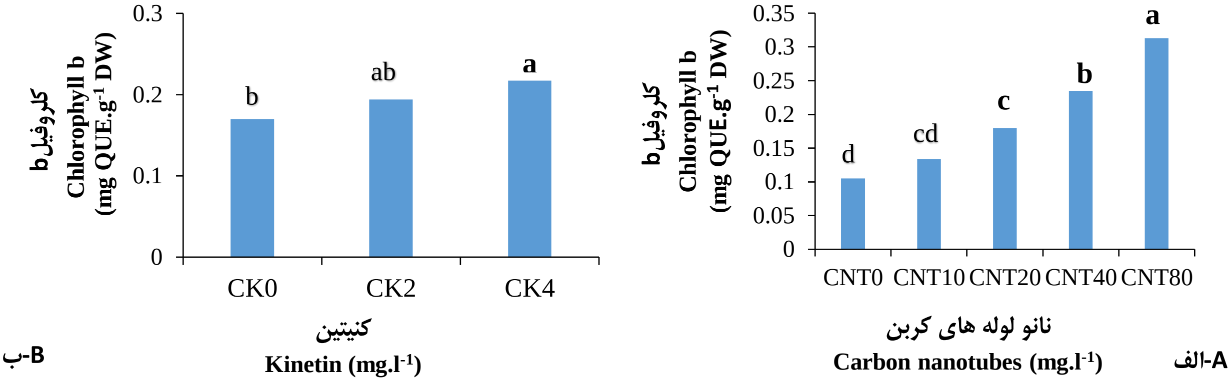
CNT0: control, CNT10: 10 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg.l^{-1}kinetin, CK4: 4 mg.l^{-1} of kinetin (DMRT, p≤0.05).

کلروفیل b

در رابطه با کلروفیل b، ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین تأثیر معنی‌داری را نشان ندادند. در مقابل، غلظت‌های مختلف نانو لوله های کربن به‌طور معنی‌داری (سطح احتمال یک درصد) محتوای کلروفیل b را تحت تأثیر قرار داده است (جدول ۲). طوری‌که به‌موازات افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل b (۰/۳۱۳ میلی‌گرم) مربوط به تیمار ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن بوده و کمترین میزان (۰/۱۰۵ میلی‌گرم) در شاهد ثبت گردید (شکل ۷- الف). با توجه به نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها، تأثیر غلظت‌های مختلف کینتین بر میزان کلروفیل b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در واقع، همزمان با افزایش غلظت کینتین، میزان کلروفیل b نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کلروفیل b (۰/۲۱۷ میلی‌گرم) مربوط به تیمار چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین و کمترین میزان کلروفیل b (۰/۱۷ میلی‌گرم) در شاهد مشاهده شد که با هم اختلاف معنی‌داری داشتند (شکل ۷- ب).

کارتنوئید

محتوای کارتنوئید به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر اثر متقابل دو تیمار مورد آزمایش قرار نگرفت. از سوی دیگر، تأثیر نانو لوله‌های کربن بر محتوای کارتنوئید در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). همچنین مقایسه میانگین تأثیر نانو لوله‌های کربن بر شاخص کارتنوئید نیز بیانگر این مطلب است که همزمان با افزایش غلظت نانو لوله‌های کربن میزان کارتنوئید نیز افزایش یافته است. بیش‌ترین میزان کارتنوئید (۰/۴۸۸ میلی‌گرم) مربوط به غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان آن (۰/۱۳۳ میلی‌گرم) مربوط به شاهد بوده است (شکل ۸).

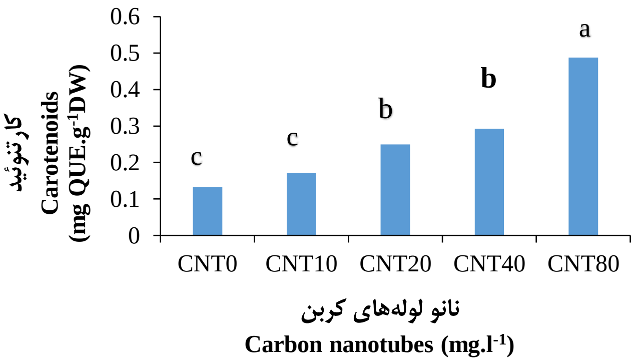


شکل ۷- تأثیر نانو لوله‌های کربن (الف) و کینتین (ب) بر میزان کلروفیل b در گیاه مریم گلی

Figure 7- The effect of carbon nanotubes (A) and kinetin (B) on chlorophyll b content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، **CNT40**: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 $mg.l^{-1}$ kinetin, CK4: 4 $mg.l^{-1}$ of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).



شکل ۸- تأثیر نانو لوله‌های کربن بر میزان کارتنوئید در گیاه مریم گلی

Figure 8- The effect of carbon nanotubes on the carotenoid content in *Salvia nemorosa*

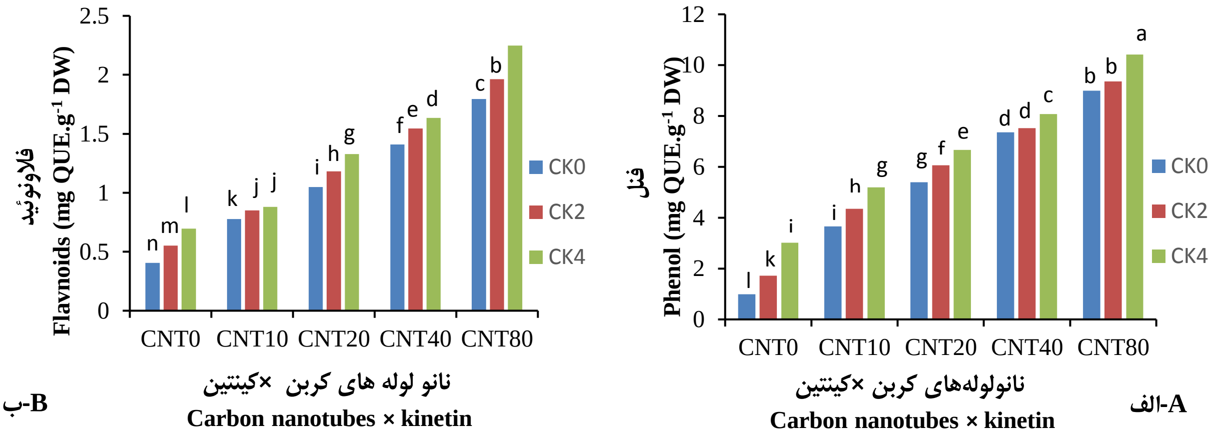
CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی

CNT0: control, CNT10: $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT20: 20 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT40: 40 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes, CNT80: 80 $mg.l^{-1}$ of carbon nanotubes (DMRT, $p \leq 0.05$).

فنل و فلاونوئید

مطابق با جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، اثر متقابل تیمارهای نانو لوله‌های کربن و کینتین بر محتوای فلاونوئید کل در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین داده‌ها (شکل ۹- الف) نشان داد که با افزایش غلظت‌های نانو لوله‌های کربن و کینتین، محتوای فلاونوئید کل به‌طور مثبتی افزایش یافته است. بر این اساس، بیشترین محتوای فلاونوئید کل تحت تیمارهای ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین به‌دست آمد. همچنین کمترین محتوای فلاونوئید کل در تیمار شاهد ثبت شد.

بررسی محتوای فنل کل تحت ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین بیانگر تأثیر معنی‌دار این دو عامل در سطح احتمال یک درصد بود (جدول ۱). مشابه با محتوای فلاونوئید کل، افزایش غلظت‌های نانو لوله‌های کربن به همراه کینتین موجب تولید بیشترین محتوای فنل کل شد. بیشترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین مشاهده شد. علاوه‌براین ، کمترین محتوای فنل کل در ترکیب تیماری شاهد به‌دست آمد (شکل ۹- ب). کاربرد غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی چند جداره در کشت کالوس مرزه خوزستانی سبب افزایش بیش از دو برابری در میزان تولید رزمارینیک اسید، سینامیک اسید، فنول کل و فلاونوئید کل و همچنین میزان وزن تر و خشک کالوس شده است (Ghorbanpour, 2015).



شکل ۹- اثر متقابل نانو لوله‌های کربن × کینتین بر شاخص‌های فنل (الف) و فلاونوئید (ب) مریم گلی

Figure 9- The interaction effect of carbon nanotubes ×kinetin on phenol (A) and flavonoid (B) content in *Salvia nemorosa*

CNT0: شاهد، CNT10: ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT20: ۲۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT40: ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CNT80: ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربنی، CK0: شاهد، CK2: دو میلی‌گرم بر لیتر کینتین، CK4: چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین

CNT0: control, CNT10: 10 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT20: 20 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT40: 40 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CNT80: 80 mg.l^{-1} of carbon nanotubes, CK0: control, CK2: 2 mg.l^{-1} kinetin, CK4: 4 mg.l^{-1} of kinetin (DMRT, $p \leq 0.05$).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، اثر متقابل نانو لوله‌های کربن و کینتین بر رشد و باززایی و خواص فیتوشیمیایی مریم گلی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که برخی خصوصیات رشدی از جمله، وزن تر، تعداد شاخه، تعداد برگ، تعداد ریشه، سطح برگ، طول ریشه، ارتفاع گیاهچه، درصد زنده‌مانی، درصد جوانه‌زنی، محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی تحت تأثیر اثر متقابل دو فاکتور قرار نگرفتند. در مقابل، ویژگی‌های فیتوشیمیایی مریم گلی از جمله محتوای فلاونوئید کل و فنل کل تحت تأثیر اثرات مثبت ترکیب تیماری نانو لوله‌های کربن و کینتین (۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین) افزایش یافتند که این غلظت به‌منظور افزایش ترکیبات فنلی قابل توصیه است. همچنین برخی ویژگی‌های رشدی در غلظت ۸۰ میلی‌گرم بر لیتر نانو لوله‌های کربن و چهار میلی‌گرم بر لیتر کینتین بیشترین مقدار را تولید کردند. با وجود نتایج حاصل از این مطالعه، همچنان می‌توان در تحقیقات آینده از غلظت‌های بالاتر نانو لوله‌های کربن به‌منظور افزایش خواص فیتوشیمیایی و بهره‌وری سایر گیاهان دارویی استفاده نمود.

References

1- Aghasi Kermani, S.H., Hokmabadi, H., Ghanbari Jahromi, M., & Nezami, S.R. (2018). *Investigating the effect of nano compounds in the stages of establishment and in vitro processing of pistachio P. integrima x Pistacia atlantica vegetative base*. Iranian Pistachio National Conference, Iran.

2- Alimohammadi, M., Xu, Y., Wang, D., Biris, A.S., & Khodakovskaya, M.V. (2011). Physiological responses induced in tomato plants by a two-componenet nanostructural system composed of carbon nanotubes conjugated with quantum dots and its *in vivo* multimodal detection. *Nanotechnology*, *22*(1), 112-118. https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/29/295101

3- Bagheri, A., Moshiri, S., & Khosravinia, S. (2013). Investigating the reaction of explants and growth regulators on callus formation, root formation and *in vitro* regeneration of Iranian black cumin. *Scientific-Research Journal of Crop Plant Biotechnology*, *3*(8), 53-61. (In Persian).

4- Bhat, S., Maheshwari, P., & Kumar, A. (2002). *Mentha* species: *In vitro* regeneration and genetic transformation. *Molecular Biology Today*, *3*, 11-23.

5- Bhojwani, S.S., & Dantu, P.K. (2013). Plant tissue culture: an introductory text. Springer Science & Business Media, New Delhi, 309.

6- Cañas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M., Ambikapathi, R., Lee, E.H. & Olszyk, D. (2008). Effects of functionalized and nonfunctionalized single-walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *27*(9), 1922-1931. https://doi.org/10.1897/08-117.1

7- Dobranszki, J., Jambor-Benczur, E., Magyar-Tabori, K., & Hudak, I. (2005). Model experiments for establishment of in vitro culture by micrografting in apple. *International journal of Horticultural Science*, *11*(1), 47-49. https://doi.org/10.31421/IJHS/11/1/557
8- Ebadi, M., Farzaneh, A., Ebadi, E., & Nemati, S.H. (2012). Evaluation of some germination factors of *Salvia sahendica* Boiss & Buhse in drought and salt stresses conditions. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *10*(4), 764-773. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/GSC.V10I4.20387
9- Fallahi, J., Ebadi, M.T., & Ghorbani, R. (2009). The effects of salinity and drought stresses on germination and seedling growth of clary (*Salvia sclarea*). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *1*(1), 57-67. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22077/escs.2009.7
10- Farshadfar, M., & Bakhshi Khaniki, R. (2014). Basics of biotechnology and plant tissue culture first edition. Payam Noor University Publications, Tehran, p. 249.
11- Ghorbanpour, M. (2015). Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of Salvia officinalis plant in response to nano-titanium dioxide. *Indian Journal of Plant Physioligy*, *20*(1), 249-256. (In Persian). https://doi.org/10.1007/s40502-015-0170-7
12- Govil, J.N., & Singh, V.K. (2010). Recent progress in medicinal plant. Vol 1. Studium Press, Texas, 485.
13- Jafarnia, S., Khosroshahi, S., Safayi, M., Madah yazdi, V., & Zahmatkeshan, A. (2009). Aromatic and medicinal plants. First Edition. Publications of Iran's Green Agriculture Education Complex, Tehran, p. 168.
14- Ke, P.C., Lin, S., Reppert, J., Rao, A.M., & Lou, H. (2011). Uptake of carbon-based nanoparticles by mammalian cells and plants. In: Sattler KD (ed) Handbook of nanophysics: nanomedicine and nanorobotics. CRC Press, New York, p. 30.
15- Khodakovskaya, M.V., de Silva, K., Biris, A.S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *American Chemical Society Nano*, *6*(3), 2128-2135. https://doi.org/10.1021/nn204643g
16- Khodakovskaya, M.V., Kim, B.S., Kim, J.N., Alimohammadi, M., Dervishi, E., Mustafa, T., & Cerniglа, C.E. (2013). Carbon nanotubes as plant growth regulators: Effects on tomato growth, reproductive system and soil microbial community. *Small*, *9*(1), 115-123.
17- Kumar, S., Kanwar J.K., & Sharma, D.R. (2015). *In vitro* propagation of *Lilium*: Review paper. *Advances in Horticultural Science*, *20*, 181-188. https://doi.org/10.1400/53266
18- Lacerda, L., Russier, J., Pastorin, G., Herrero, M.A., Venturelli, E., Dumortier, H., Al-Jamal, K.T., Prato, M., Kostarelos, K., & Bianco, A. (2012). Translocation mechanisms of chemically functionalized carbon nanotubes across plasma membranes. *Biomaterials*, *33*(1), 3334-3343. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.024
19- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A.S., & Khodakovskaya, M.V. (2013). Impact of carbon nanotubes exposure to seeds of valuable crops. *American Chemical Society Applied Materials and Interfaces*, *5*(2), 7965-7973. https://doi.org/10.1021/am402052x
20- Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophylls and cartenoides: Pigments of photosynthetic bio-membranes. In: Methods in Enzymol. (Eds. S.P. Colowick, N.O. Kaplan,). Academic press. New York, *48*(1), 350-382.
21- Mostallino, M.C., Mascia, M.P., Pisu, M.G., Busonero, F., Talani, G., & Biggio, G. (2004). Inhibition by miltirone of up-regulation of GABAA receptor α4 subunit mRNA by ethanol withdrawal in hippocampal neurons. *European Journal of Pharmacology*, *494*, 83-90.
22- Omidbeygi, R. (2005). Production and processing of medicinal plants. First Edition. Tehran: Publications of Astan Ghods Razavi, Tehran, p. 348.
23- Rai, M., & Ingle, A. (2012). Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *94*(2), 287-293. https://doi.org/10.1007/s00253-012-3969-4
24- Salimpour, F., Mazooji, A., Mazhar, F., & Barzin, G. (2014). Comparative study of antibacterial properties of four species of *Salvia* L. as a medicinal plant. *Journal of Research In Medical Sciences*, *37*(4), 205-210. (In Persian with English abstract)
25- Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, *28*(1), 49-55. https://doi.org/10.5344/ajev.1977.28.1.49
26- Smith, R.H. (2000). *Plant Tissue Culture*: Techniques and Expriments. Academic Press, United States, 231.
27- Tripathi, S., Sonkar, S.K., & Sarkar, S. (2011). Growth stimulation og gram (*Cicer arietinum*) plant by water soluble carbon nanotubes. *Nanoscale*, *3*(3), 1176-1181. https://doi.org/10.1039/C0NR00722F

28- Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U. & Eris, C. (1994). Terpenoids from Salvia nemorosa. *Phytochemistry*, *35*(4), 1065-1067. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)90672-1
29- Wang, X., Han, H., Liu, X., Gu, X., Chen, K., & Lu, D. (2012). Multi-walled carbon nanotubes can enhance root elongation of wheat (*Triticum aestivum*) plants. *Journal of Nanoparticle Research*, *14*(6), 1-10. https://doi.org/10.1007/s11051-012-0841-5